Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H.-W. Altmann

MORPHOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM ORGANELLEN - TURNOVER IN LEBERZELLEN DER RATTE NACH 2-METHYL-4-DIMETHYL-AMINOAZOBENZEN

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Dieter Russ
aus Schlierbach/Württemberg

Würzburg, den 20. April 1982

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H.-W. Altmann

MORPHOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM ORGANELLEN - TURNOVER IN LEBERZELLEN DER RATTE NACH 2-METHYL-4-DIMETHYL-AMINOAZOBENZEN

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Dieter Russ
aus Schlierbach/Württemberg

Würzburg, den 20. April 1982

Referent:	Professor Dr. med. U. Pfeifer
Korreferent:	Professor Dr. med. H.-W. Altmann
Dekan:	Professor Dr. med. K. A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 29.6.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung

B. Methoden

1. Versuchsanordnung

2. Morphometrische Auswertung

C. Ergebnisse

1. Körpergewicht und Lebergewicht

2. Morphometrische Auswertung des Cytoplasmas

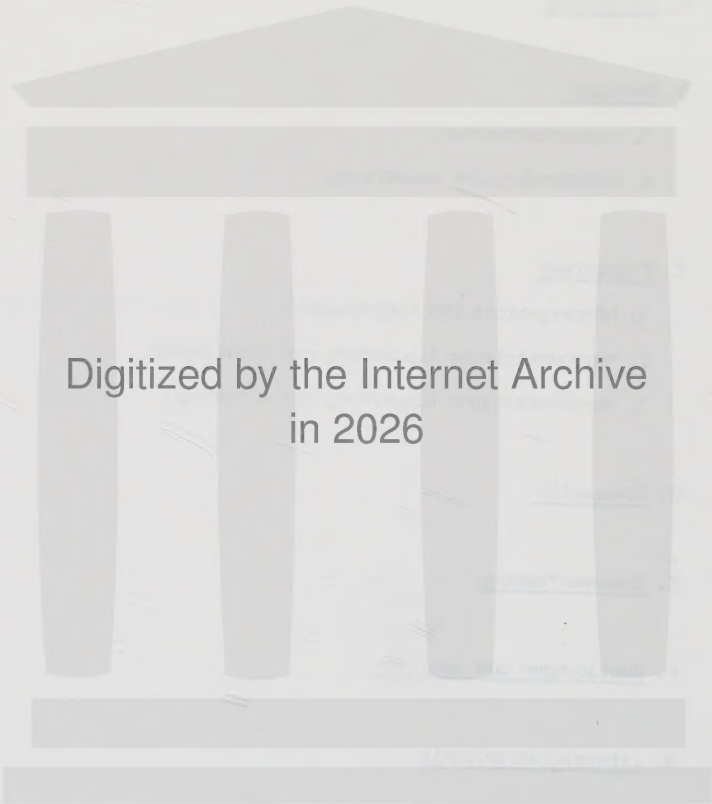
3. Morphometrische Auswertung der Autophagie

D. Diskussion

E. Zusammenfassung

F. Abbildungen und Tabellen

G. Literaturverzeichnis


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543526_0052

I. E I N L E I T U N G

Heterophagie und celluläre Autophagie sind Wege für den Abbau von Substanzen. Als Autophagie bezeichnet man dan Abbau zelleigener Strukturen durch Lysosomen.

Den ersten Hinweis auf das Prinzip der cellulären Autophagie gab ALTMANN (1955), als er die Vorstellung einer portionsweisen Ausgliederung und eines intracellulären Abbaus zelleigenen Materials formulierte. Entscheidenden Anteil am Entstehen eines Konzeptes, das die celluläre Autophagie darstellt, hatten de DUVE und WATTIAUX (1966), die ein noch heute gültiges Schema entwickelten, das den Ablauf der cellulären Autophagie wiedergibt. Ihrem Schema nach gliedert sich die celluläre Autophagie in folgende Teilschritte, nämlich Segregation, Fusion, Destruktion und Degradation.

Dieser morphologischen Einteilung wurde eine - allerdings noch unvollständige - biochemische Klassifizierung gegenübergestellt (PFEIFER 1976); unvollständig, weil der Segregation und der Destruktion noch kein biochemisches Korrelat zugeordnet werden konnte. Dies eröffnet in der Praxis einen Zugang sowohl von der biochemischen Seite durch turn-over-Messungen als auch von der morphologischen Seite durch morphometrische Methoden. Damit lassen sich auch die Ergebnisse der beiden Verfahrensweisen gegenseitig überprüfen.

Verschiedentlich sind in der Vergangenheit die Einflüsse von Substanzen auf die celluläre Autophagie untersucht worden. Dabei ergab sich beispielsweise eine Steigerung der Autophagie durch die Gabe von Glucagon (ASHFORD und PORTER 1962, DETER und de DUVE 1967, ARSTILA und TRUMP 1968, ERICSSON 1969, DETER 1971) und bei der Blockade der verschiedenen Teilschritte der Autophagie die Zunahme des vor dem Stop liegenden Vorgangs und eine Abnahme des hinter dem Stop liegenden Vorgangs unter den Voraussetzungen einer konstanten Neusynthese (Übersicht bei PFEIFER 1976).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Frage geklärt werden, ob der Mitochendrienreichtum der Leberzelle, der nach Gabe von 2-Methyl-4-Dimethylaminozobenzen (2-Me-DAB) auftritt (Striebich et al. 1953, LAFONTAINE und ALLARD 1964), Folge

einer Segregationsblokade ist. Das wäre nach den Ergebnissen des turn-over-Versuchs von FIALA et al. (1974) naheliegend, der diese Mitochondrienzunahme auf einen verminderten Abbau zurückführt.

Für diese morphometrische Analyse wurden die Methoden verwendet, die in den letzten Jahren entwickelt (WEIBEL et al. 1966, LOUD 1968, WEIBEL 1969) und speziell für die Auswertung Autoplager Vacuolen mehrfach modifiziert wurden (PFEIFER und SCHELLER 1975, ORMANNS 1976, PFEIFER 1976).

II. METHODEN

1. Versuchsanordnung

48 männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Initialgewicht von 165 - 220 g wurden unter Standardbedingungen bei 23° C und einem gleichbleibenden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten (die Lichtperiode dauerte von 7 - 19 Uhr, die Dunkelperiode von 19 - 7 Uhr). Es wurde eine Versuchsgruppe und eine Kontrollgruppe mit je 24 Tieren gebildet. Die Versuchstiere erhielten einmal täglich je 10g/Tier mit DAB in der Konzentration von 0,06 Prozent angereichertes Futter, die Kontrolltiere die gleiche Menge standardisierten Futters (Herilan®). Die Fütterung fand jeweils abends um 17 Uhr statt. Trinkwasser wurde nach Belieben gegeben. Die Tötung der Tiere erfolgte 30, 45 und 60 Tage nach Beginn der Fütterung. Aus jeder Gruppe wurden um 10 Uhr, 13 Uhr, 16 Uhr und 18 Uhr zwei Tiere getötet, wobei die Tötung in einem vom Tierstall getrennten Operationsraum unter Äthernarkose erfolgte.

Kleine Gewebestücke wurden aus dem rechten Teil des Lebermittellappens entnommen und in 1,5 % phosphatgepufferter OsO_4-Lösung bei 4° C über zwei Stunden fixiert, anschließend dehydriert und über Propylenoxid eingebettet. Drei Blöcke pro Tier wurden für die Lichtmikroskopie verwendet. Von diesen drei Blöcken wurden Semidünnschnitte hergestellt, die mit Giemsalösung gefärbt wurden. Mit dem Lichtmikroskop wurde anschließend jeweils ein Parenchymbezirk ausgewählt, der an ein Periportalfeld grenzte und für die Elektronenmikroskopie entsprechend getrimmt wurde.

Danach wurden Dünnschnitte von 60 - 80 mm Dicke mit dem Ultramikrotom OmU_2 (REICHERT) hergestellt und auf Formvar geschichtete Kupfernetze aufgezogen. Die Dünnschnitte wurden mit Bleicitrat kontrastiert und mit einem Siemens Elektronenmikroskop I A bei 60 kV untersucht.

2. Morphometrische Auswertung

Für die Auswertung wurden die Punktrastermethode für das Lichtmikroskop (ORMANNS 1976) und für das Elektronenmikroskop das direkte Messen am Fluoreszenzschirm verwendet (PFEIFER und SCHELLER 1975, PFEIFER 1976).

Das Grundprinzip der Punktrastermethode besteht darin, daß auf dem Leuchtschirm eines Projektionsmikroskops ein quadratisches Punktraster mit einem Abstand von einem Zentimeter aufgedruckt ist. Der gesuchte Volumenanteil einer Struktur ergibt sich nun als Quotient der über der Struktur liegenden Punkte und der Gesamtzahl der Punkte. Dabei handelt es sich um einen relativen Volumenanteil, d.h. man erhält den prozentualen Anteil einer Struktur am Gesamtvolumen (Referenzvolumen).

Für jedes einzelne Präparat wurde lichtmikroskopisch an Semidünnschnitten der prozentuale Volumenanteil des Cytoplasmas bestimmt. Diese Werte dienten zur exakteren Bestimmung der am Elektronenmikroskop ausgewerteten Cytoplasmafläche anstelle des bisher angenommenen Durchschnittswertes von 80 % Cytoplasma.

Mit dieser Methode wurden außerdem an elektronenmikroskopischen Aufnahmen die freien Volumina von Mitochondrien, endoplasmatischen Retikulum (ERGS)[1], Mikrobodies, Glykogen, Lysosomen, Fett sowie Kernvolumen bestimmt. Pro Präparat wurden zwei Aufnahmen (Primärvergrößerung 5200fach) durchgezählt und der Mittelwert genommen (Anzahl der Testpunkte über dem Cytoplasma prozentual zur Gesamtpunktzahl).

Mit der direkten Messung am Fluoreszenzschirm des Elektronenmikroskops wurden die Flächen der autophagen Vakuolen bestimmt, die Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Mikrobodies und Glykogen enthielten.

Als Flächeneinheit dienten die quadratischen Ausschnitte der Kupfernetze; wobei so vorgegangen wurde, daß die jeweiligen Eckpunkte der Quadrate durch ein Zählwerk, das an den beiden Stelltrieben angebracht war, als Koordinatenpaar ausgedrückt werden konnten. Mittels eines Rechenprogramms für geradlinig begrenzte Flächen konnte dann die Fläche berechnet werden. Pro Präparat wurden sechs Quadrate verwendet, deren Flächen addiert wurden. Die exakte Fläche ergab sich dann unter Berücksichtigung des oben genannten lichtmikroskopisch gewonnenen Cytoplasmaanteils der einzelnen Präparate.

---

[1] Die Bezeichnung "endoplasmatisches Retikulum" wird hier für das in den anderen Arbeiten sogenannte ERGS verwandt. Dieses Kompartiment umfaßt das endoplasmatische Retikulum im engeren Sinne, die Golgi-Felder, die freien Ribosomen und die cytoplasmatische Grundsubstanz.

Die Messung der Autophagen Vakuolen erfolgte unter Verwendung zweier Durchmesser, die auf einer auf dem Fluoreszenzschirm angebrachten Skala abgelesen wurden. Bei der Berechnung der Fläche wurde die Vergrößerung und die Verzerrung durch den schräg gestellten Schirm berücksichtigt (PFEIFER 1976). Die Auszählung und Flächenbestimmung der Autophagen Vakuolen wurde bei einer Vergrößerung von 10 000 vorgenommen, wobei als Kriterium für die Autophagen Vakuolen galt, daß mindestens die Hälfte des Organells von einer Membran umgeben und der Inhalt, also das segregierte Organell, eindeutig identifizierbar sein mußte.

Abschließend wurden noch die Volumenanteile der einzelnen Autophagen Vakuolen bestimmt, indem der Quotient aus segregierten Organellen und Cytoplasmafläche gebildet wurde. Für die Mitochondrien wurde noch zusätzlich die segregierte Fraktion SF ermittelt. Darunter versteht man den Quotienten aus segregierten und freien Mitochondrien.

III. E R G E B N I S S E

Vorbemerkung: Es wurden nur die Tiere, die am 45. und 60. Tag getötet wurden, ausgewertet.

1. Körpergewicht und Lebergewicht

Die Tiere der Kontrollgruppe (45 Tage) wiesen ein durchschnittliches Lebergewicht von 6,4 g auf (SEM 0,27) bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 198 g (SEM 6,55). Die entsprechenden Werte für die DAB-Gruppe betrugen 7,0 g (SEM 0,30) und 180 g (SEM 4,55). Nur für die Körpergewichte war damit ein signifikanter Unterschied nachweisbar. ($p<0,05$).

Dieselbe Berechnung ergab bei der Kontrollgruppe (60 Tage) ein mittleres Lebergewicht von 5,9 g (SEM 0,19) und ein mittleres Körpergewicht von 211 g (SEM 5,64). Die Werte für die DAB-Gruppe lauteten 6,4 g (SEM 0,25) und 185 g (SEM 3,98). Wiederum gab es nur bei den Körpergewichten einen allerdings hochsignifikanten Unterschied ($p<0,005$).

Die außerdem vorgenommenen Vergleiche der Körpergewichte innerhalb der DAB-Gruppen, Ausgangsgewichte und Körpergewichte zum Zeitpunkt der Tötung, ergaben keine signifikanten Unterschiede, während es bei den Kontrolltieren eine signifikante Zunahme des Körpergewichts bei der 60-Tage-Gruppe gab ($p<0,05$).

Die durchschnittlichen relativen Lebergewichte (Lebergewicht/Körpergewicht) betrugen bei der DAB-Gruppe (45 Tage) 3,88 (SEM 0,46) und 3,16 (SEM 0,28) für die Kontrollgruppe. Die entsprechenden Werte bei den 60-Tage-Gruppen lauteten 3,44 (SEM 0,26) sowie 2,82 (SEM 0,31). Somit ergab sich sowohl bei den 45-Tage-Gruppen ($p<0,01$) als auch bei den 60-Tage-Gruppen ($p<0,001$) ein signifikanter Unterschied (Tab. I).

Auch bei der Bestimmung der relativen Mitochondrienmassen (Volumenanteil der Mitochondrien x Lebergewicht/Körpergewicht) ließ sich ein signifikanter Unterschied bei den 45-Tage-Gruppen ($p<0,001$) und den 60-Tage-Gruppen (0.01) nachweisen. Die einzelnen Durchschnittswerte betrugen bei den DAB-Gruppen 1,20 (SEM 0,19) und 0,95 (SEM 0,15) sowie 0,84 (SEM 0,10) und 0,71 (SEM 0,12) bei den Kontrollgruppen nach 45 bzw. 60 Tagen (Tab. I).

2. Morphometrische Auswertung des Cytoplasmas

Hier wurde das relative Volumen der verschiedenen Kompartimente bestimmt und in Prozentwerten angegeben. Dabei konnten bei den Tieren bei der 45-Tage-Gruppe folgende Werte festgestellt werden:

Der Mittelwert lag bei den Mitochondrien bei 30,95 % (SEM 1,2) für die mit DAB gefütterten Tiere, bei 26,4 % (SEM 0,81) für die Kontrolltiere. Das bedeutet einen signifikanten Unterschied. ($p<0,005$). Hinsichtlich der Tagesrhythmik(Abb.1) ließen sich - anders als bei ROHR et al. 1980, BERTLING 1975 - keine allzu großen Schwenkungen feststellen. Lediglich eine geringe Zunahme konnte gezeigt werden. Bei den DAB-Tieren lag der 10 Uhr-Wert bei 30,1 % und stieg auf 31,8 % um 18 Uhr. Die entsprechenden Werte der Kontrolltiere lauteten 26,5 % bzw. 28,2 %.

Für das endoplasmatische Retikulum (Abb. 2) betrugen die Mittelwerte 53,6 % (SEM 2.0) für die DAB-Tiere und 59,9 % (SEM 1,39) für die Kontrolltiere. Auch hier wies der t-Test einen signifikanten Unterschied auf ($p<0,05$). Eine Tagesrhythmik mit den niedrigsten Werten um 10 Uhr (46,1 % bzw. 55,0 %) und den höchsten Werten um 18 Uhr (57,8 % bzw. 64,2 %) zeigte sich in Übereinstimmung mit Ergebnissen bisheriger Untersuchungen (BERTLING 1975).

Die entsprechenden Werte für das Glykogen (Abb. 2) betrugen 11,8 % (SEM 2,3) bzw. 10,3 % (SEM 2,03). Hier war ein gegensinniges Verhalten zum ER auffällig, nämlich Höchstwerte um 10 Uhr von 19,2 % bzw. 16,2 % und Tiefstwerte um 18 Uhr von 6,5 % bzw. 5,8 %, was ebenfalls in der Literatur bereits beschrieben wurde (BERTLING 1975 und MÜLLER 1976).

Für die Mikrobodies (Abb. 2) konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p<0,005$) festgestellt werden. Die Mittelwerte ergaben 1,6 % (SEM 0,14) und 1,1 % (SEM 0,11). Ein cirkadianer Rhythmus fiel nicht auf. Bei den Kontrolltieren schwankten die Werte nur zwischen 1,1 % und 1,2 %, während die DAB-Tiere - mit Ausnahme des 13 Uhr-Wertes - Werte von 1,5 % aufwiesen.

Mit derselben Untersuchung ließ sich bei den Tieren der 60-Tage-Gruppe (Abb. 2) kein signifikanter Unterschied bei allen untersuchten Organellen nachweisen.

Die Werte im einzelnen: Mitochondrien 27,7 % (SEM 1,63) für die DAB-Tiere und 25,5 % (SEM 1,63) für die Kontrolltiere, ER 60,2 % (SEM 1,61) bzw. 60,8 % (SEM 0,84), Glykogen 9,0 % (SEM 0,91) bzw. 11,1 % (SEM 1,34) und Mikrobodies 1,5 % (SEM 0,11) bzw. 1,3 % (SEM 0,97). Die tagesrhythmischen Veränderungen konnten nicht in der oben genannten Weise bestätigt werden.

Bei den Mitochondrien waren sie in gleichem Maß vorhanden wie in der 45-Tage-Gruppe. Die Zunahme erfolgte von 24,4 % um 10 Uhr auf 33,9 % um 18 Uhr unter DAB-Gabe und von 21,6 % auf 26,8 % unter der Gabe von standardisiertem Futter. Beim endoplasmatischen Retikulum fand sich ein nahezu konstanter Anteil (60,0 %) mit einem Gipfel um 16 Uhr (65,6 %) und einem Abfall auf 54,3 % um 18 Uhr für die DAB-Tiere, was sich in gleicher Weise bei den Kontrolltieren mit einem nahezu homogenen Verlauf bei Prozentwerten um 60 % und einem Ansteig auf 63,8 % um 16 Uhr bestätigte. Für Glykogen wurden die niedrigsten Werte diesmal um 16 Uhr beobachtet (DAB 6,0 % und Kontrolltiere 7,5 %) während die höchsten Werte wiederum um 10 Uhr mit 11,2 % bzw. 16,6 % nachgewiesen werden konnten. Mikrobodies wiesen eine leichte Zunahme im Tagesverlauf bei beiden Gruppen auf.

3. Morphometrische Auswertung der Autophagie

Es wurde der Flächen- bzw. Volumenanteil der verschiedenen Autophagen Vakuolen am Cytoplasmavolumen berechnet.

Dazu wurde pro Präparat bei den DAB-Tieren der 45-Tage-Gruppe eine durchschnittliche Cytoplasmafläche von $3,92 \times 10^4$ μm^2 (SD 0,19) und von $3,76 \times 10^4$ μm^2 (SD 0,31) bei der 60-Tage-Gruppe untersucht. Die entsprechenden Werte bei den Kontrolltieren ergaben $3,79 \times 10^4$ μm^2 (SD 0,42) und $3,84 \times 10^4 \mu m^2$ (SD 0,25).

Bei den Autophagen Vakuolen, welche Mitochondrien als Inhalt aufwiesen und für diese Untersuchung am interessantesten waren, ergaben sich sowohl bei den 45- (Abb. 3) wie auch bei den 60-Tage-Gruppen (Abb. 4) signifikante Unterschiede mit Hilfe des t-Tests. Die Durchschnittswerte betrugen für die DAB-Tiere der 45-Tage-Gruppe $1,03 \times 10^{-4}$ (SEM 0,22), Kontrolltiere $0,20 \times 10^{-4}$ (SEM 0,12). Bei der 60-Tage-Gruppe der DAB-gefütterten Tiere lautete der Wert $0,46 \times 10^{-4}$ (SEM 0,30), während die Kontrolltiere einen Wert von $0,16 \times 10^{-4}$ (SEM 0,17) aufwiesen.

Die beobachteten Signifikanzunterschiede waren höher ($p<0,005$) bei den 45-Tage-Gruppen als bei den 60-Tage-Gruppen ($p<0,05$).

Auch was den Tagesrhythmus anbelangt, konnte bei den Kontrolltieren die gleiche Verlaufsform nachgewiesen werden, mit einem Maximum allerdings erst um 16 Uhr und Minima um 10 Uhr und 18 Uhr, wobei zu diesem Zeitpunkt keine Vakuolen mehr auftraten; ein Ergebnis, das aus bisherigen Untersuchungen bekannt war (PFEIFER 1971, 1973, 1977). Für die DAB-gefütterten Tiere zeigte sich diese Tagesrhythmik nur bei den 45-Tages-Tieren mit Maximum um 13 Uhr, während bei den 60-Tages-Tieren der allerdings gegenüber den anderen Werten nur geringfügig erhöhte Spitzenwert um 10 Uhr festgestellt wurde. Anschließend nimmt die Kurve einen fast konstanten Verlauf, um dann um 18 Uhr den Nullwert zu erreichen.

Für die Vakuolen, die endoplasmatischen Retikulum (Abb. 5) enthielten, ergab sich nur für die Tiere der 45-Tage-Gruppen ein allerdings hoch signifikanter Unterschied ($p<0,005$).

Die Werte im einzelnen: $0,63 \times 10^{-4}$ (SEM 0.07) und $0,16 \times 10^{-4}$ (SEM 0.08) für die DAB-bzw. die Kontrolltiere nach 45 Tagen, $0,46 \times 10^{-4}$ (SEM 0.15) sowie $0,21 \times 10^{-4}$ (SEM 0.08) für die nach 60 Tagen.

Keinerlei signifikante Unterschiede ergaben sich beim Vergleich der glykogenhaltigen Vakuolen. Hier betrugen die Mittelwerte $0,22 \times 10^{-4}$ (SEM 0,04) und $0,13 \times 10^{-4}$ (SEM 0,04) für die DAB- und Kontrolltiere nach 45 Tagen und $0,12 \times 10^{-4}$ (SEM 0,03) bzw. $0,10 \times 10^{-4}$ (SEM 0,03) nach 60 Tagen.

Abschließend wurden die Mikrobodies (Abb. 5) untersucht. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied bei der 45-Tage-Gruppe, wohl aber bei der 60-Tage-Gruppe (p 0.05). Folgende Einzelwerte wurden gemessen: Mittelwerte $0,09 \times 10^{-4}$ (SEM 0,04) unter DAB-Gabe nach 45 Tagen und $0,07 \times 10^{-4}$ (SEM 0,04) bei den Kontrolltieren zum gleichen Zeitpunkt. Nach 60 Tagen lauteten die entsprechenden Werte $0,19 \times 10^{-4}$ (SEM 0,05) und $0,06 \times 10^{-4}$ (SEM 0,05).

Die oben erwähnte Tagesrhythmik konnte in ihrem groben Verlauf, d.h. relativ niedrige Werte am Morgen, Maxima am Nachmittag und Tiefstwerte, ja meist sogar Nullwerte um 18 Uhr bestätigt werden.

Die Auswertung der Gesamtzahl der Autophagen Vakuolen und die Berechnung der segregierten Fraktion der Mitochondrien bildeten den Abschluß der Untersuchungen. Hochsignifikante Unterschiede sowohl nach 45 (Abb. 3) wie auch nach 60 Tagen (Abb. 4) ließen sich bei der Gesamtzahl der Autophagen Vakuolen (genauer: dem Volumenanteil der Autophagen Vakuolen) nachweisen ($p<0,005$ für beide Zeitpunkte). Folgende Ergebnisse ergaben sich nach 45 Tagen (DAB-Werte zuerst genannt): $1,96 \times 10^{-4}$ (SEM 0,24) und $0,85 \times 10^{-4}$ (SEM 0,29). Die entsprechenden Zahlen lauteten $1,25 \times 10^{-4}$ (SEM 0,24) und $0,37 \times 10^{-4}$ (SEM 0,09) nach 60 Tagen.

Die methodischen nach demselben Prinzip berechneten signifikanten Unterschiede waren bei der segregierten Fraktion der Mitochondirien nach 45 Tagen (Abb. 3) höher (p 0,01) als nach 60 Tagen (Abb. 4) (p 0,05). Die Einzelwerte betrugen bei den DAB-Tieren nach 45 Tagen $3,37 \times 10^{-4}$ (SEM 0,62) und $1,18 \times 10^{-4}$ (SEM 0,54) bei den Kontrolltieren, nach 60 Tagen $1,86 \times 10^{-4}$ (SEM 0,56) bzw. $0,65 \times 10^{-4}$ (SEM 0,28).

Eine Zusammenstellung der wichtigsten Ergebnisse erfolgt in der Tabelle II.

Die Mittelwert- und Standardfehlerberechnung erfolgte aus den Ergebnissen von acht Tieren, wobei pro Tier sechs Quadrate ausgezählt wurden.

IV. D I S K U S S I O N

Wie kein anderes Forschungsgebiet bietet gerade die celluläre Autophagie die günstige Gelegenheit eines zweiseitigen methodischen Vorgehens. Standen anfänglich biochemische Arbeiten im Vordergrund, so hatte sich dieses nach der Integration der zellulären Autophagie in das Lysosomenkonzept (de DUVE und WATTIAUX 1966) geändert. Besonders gefördert wurde dieser Prozeß durch die Entwicklung einer morphometrischen Arbeitsweise, die zum ersten Mal die Möglichkeit bot, quantitative und reproduzierbare Ergebnisse (elektronenmikroskopische Bilder) zu liefern. Für diese Verfahrensweise stehen in erster Linie die Arbeiten von WEIBEL (1963, 1966, 1969) und von LOUD (1968), die gewissermaßen die Bedeutung der Morphologie auf eine Stufe mit der Biochemie stellten.

Die wichtigsten Parameter der intracellulären Degradationsvorgänge, denen die Arbeiten der letzten 20 Jahre galten, waren der Proteinabbau auf der biochemischen und die Autophagen Vakuolen auf der morphologischen Seite. Dabei wurden die Veränderungen dieser beiden Parameter nach Gabe von verschiedenen Substanzen bzw. unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht. So galten die ersten Arbeiten dem Einfluß von Glucagon auf Proteinabbau und Autophagie. Die Ergebnisse von MILLER 1960 und WOODSIDE et al. 1974 zeigten, daß die Gabe von Glucagon den Proteinabbau steigert. ASHFORD und PORTER 1962 sowie DETER 1971 wiesen für die gleiche Substanz eine Zunahme der Autophagie nach. Bei der Untersuchung des Glucagon-Antagonisten Insulin zeigten MORTIMORE und MONDON 1970, daß diese Substanz den Proteinabbau hemmt. Dasselbe Ergebnis ließ sich in den Arbeiten von AMHERDT et al. 1974 und PFEIFER 1978 nachweisen, die eine Abnahme der Autophagie nach Insulingabe feststellten.

Weitere Ergebnisse finden sich in Tabelle III, die der Arbeit von PFEIFER 1978 entnommen wurde.

Diese Untersuchungsergebnisse zum Verhältnis von Proteinabbau und Autophagie, die eine gleichsinnige Veränderung der beiden Parameter postulieren, ließen eigentlich für die vorliegende Fragestellung kein anderes Ergebnis erwarten, als daß der nachgewiesene verminderte Proteinabbau der Mitochondrien (FIALA et al. 1974) nach der Gabe von DAB mit einer Abnahme der Autophagie bei den

Mitochondrien einhergehen würde. Dafür hätte es auch eine gute Erklärungsmöglichkeit gegeben, nämlich anhand eines von PFEIFER 1976 auf der Grundlage von de DUVE und WATTIAUX 1966 entwickelten Schemas (Abb. 6).

Hätte nämlich in dieser Arbeit nachgewiesen werden können, daß erstens der relative Volumenanteil der Mitochondrien signifikant erhöht - wie aus älteren Arbeiten bekannt (STRIEBICH et al. 1953, LAFONTAINE und ALARD 1964) - und zweitens der relative Volumenanteil der mitochondrienhaltigen Autophagen Vakuolen signifikant erniedrigt wäre, so stünde dies mit der Form der Segregationsblockade im Einklang. In dieser Arbeit ließ sich zwar eine signifikante Zunahme der Mitochondrien bzw. des Volumenanteils der Mitochondrien im Cytoplasmas nachweisen - allerdings nur nach 45, nicht aber nach 60 Tagen.

Bezüglich der Autophagen Vakuolen, die Mitochondrien enthielten, ergab sich aber genau das umgekehrte Resultat, nämlich eine Zunahme der Autophagen Vakuolen nach DAB-Gabe, deren Signifikanz sowohl nach 45 wie auch nach 60 Tagen nachweisbar war.

Vor der Interpretation dieser Ergebnisse seien noch einige andere Ergebnisse von FIALA et al. (1974) erwähnt, die gleichfalls überprüft wurden.

Die Körpergewichte bei der vorliegenden Untersuchung waren fast unverändert bei den DAB-Tieren, jedoch deutlich gesteigert bei den Kontrolltieren, wobei allerdings der Zuwachs von FIALA et al. (1974) (100 g im Durchschnitt) nicht erreicht wurde. Zieht man in Betracht, daß die Ausgangsgewichte der Tiere bei FIALA et al. (1974) und der vorliegenden Arbeit verschieden waren - nämlich ca. 240 g verglichen mit 189 g bei den Kontrolltieren der 60-Tage-Gruppe - so ließ sich der enorme Gewichtszuwachs bei FIALA et al. (1974) in dieser Untersuchung gleichwohl nicht bestätigen.

Bei den Lebergewichten zeigte sich eine Zunahme unter DAB-Gabe, wobei jedoch das zusätzlich bestimmte relative Lebergewicht (Lebergewicht pro Körpergewicht) wiederum entschieden niedriger war als bei der Untersuchung von FIALA et al. (1974) keine absoluten Werte angegeben, aber ausgehend von dem angeführten Prozentsatz für das relative Lebergewicht läßt sich das Absolutgewicht berechnen, für die DAB-Tiere 12,2 g und für die Kontrolltiere 13,6 g.

Insgesamt ergibt der Vergleich zwischen den Werten von FIALA et al. (1974) und den vorliegenden Werten eine sehr starke Differenz, die nur dadurch erklärt werden kann, daß im vorliegenden Experiment durch die kontrollierte Nahrungszufuhr insgesamt weniger Nahrung angeboten wurde und somit auch eine verglichen mit den Ergebnissen der Tiere von FIALA verminderte Gewichtszunahme resultierte.

Um nun zur Frage des Mitochondrienreichtums in der Leberzelle nach DAB-Fütterung zurückzukommen, so bestand das Problem, daß FIALA et al. (1974) - wie schon erwähnt - keine Absolutwerte angegeben hat. Seine Zunahme von 70 - 200 % konnte aber aus der Arbeit von STRIEBICH et al. 1953 verifiziert werden, die Mitochondrien nach der von SHELTON et al. 1953 beschriebenen Methode in einer Petroff-Hauser'schen Bakterienzählkammer mittels eines AO-Spencer-Phasenkontrastmikroskops auszählten und dabei einen Zuwachs von 150 % für DAB erzielten (302×10^9/g Leber und 118×10^9/g Leber nach 28 Tagen).

In der vorliegenden Arbeit konnten nur Zuwachsraten von 27 % nach 45 und 17 % nach 60 Tagen festgestellt werden. Berücksichtigt man den Durchschnittswert für den Anteil von Mitochondrien am Cytoplasma, der normalerweise zwischen 20 - 25 % liegt (BERTLING 1975, PFEIFER 1978, vorliegende Arbeit), so würde den von FIALA et al. (1974) gemessenen Zuwachsraten bezogen auf diese Untersuchung ein Cytoplasmaanteil von 50 - 60 % entsprechen.

Ein Zuwachs überhaupt wäre unter zwei verschiedenen Bedingungen denkbar: Die Mitochondrien könnten entweder isoliert zunehmen oder aber die anderen Fraktionen abnehmen. Die erste Möglichkeit scheidet aus, wenn man sich die von FIALA et al. (1974) berechneten Lebergewichte betrachtet; dann nämlich hätte das Lebergewicht bei den DAB-Tieren erhöht sein müssen, tatsächlich aber wurde ein geringeres Gewicht festgestellt. Zieht man die zweite Erklärungsmöglichkeit in Betracht, so zeigt sich zumindest in der vorliegenden Arbeit eine leichte Reduktion des endoplasmatischen Retikulum. Dieser Aspekt wurde in der von FIALA et al. (1974) durchgeführten Untersuchung nicht berücksichtigt.

Damit liegt für die vorliegende Arbeit der Schluß nahe, den Zuwachs der Mitochondrien mit dieser zweiten Erklärungsmöglichkeit zu begründen.

Die unterschiedlichen Wachstumsraten bei der vorliegenden Arbeit und der von FIALA et al. (1974) sind vermutlich auf das kontrollierte Füttern zurückzuführen.

Der Mitochondrienzuwachs alleine würde dem Modell der Segregationsblockade noch nicht widersprechen. Die in der vorliegenden Untersuchung überraschend festgestellte Zunahme der Autophagen Vakuolen aber ist mit diesem Modell nicht mehr in Einklang zu bringen. Für die Erklärung dieses Phänomens ist ein anderes Modell nötig. Denkbar wäre, daß der blockierende Schritt erst auf der nachfolgenden Stufe erfolgt. Eine solche Destruktionsblockade nämlich hätte in der Tat eine Zunahme der Autophagen Vakuolen zur Folge.

Damit stellt sich die Frage, ob sich der in der Untersuchung ebenfalls festgestellte Mitochondrienzuwachs in ein solches Erklärungsmodell integrieren ließe. Dies wäre sowohl als gesteigerte Neusynthese als auch als verminderter Abbau der Mitochondrien denkbar. Eine Entscheidung, worauf die Zunahme der Mitochondrien letztlich zurückführbar ist, läßt sich auf der Grundlage der vorliegenden Arbeit nicht treffen. Hierzu sind weitere Untersuchungen mit entsprechender Fragestellung erforderlich.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Zwei Gruppen von je 24 Tieren wurden mit einem Azofarbstoff (2-Me-DAB) sowie einem standardisierten Futter über einen Zeitraum von 60 Tagen gefüttert. Nach 30, 45 und 60 Tagen wurden je 8 Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten getötet und Gewebeproben aus der Leber entnommen.

Licht- und elektronenmikroskopisch wurde die Zusammensetzung des Cytoplasmas sowie der Volumenanteil der Autophagen Vakuolen untersucht. Speziell interessierte das Verhalten der Mitochondrien und der mitochondrienhaltigen Vakuolen.

Der Volumenanteil der Mitochondrien war unter DAB-Gabe nach 45, nicht aber nach 60 Tagen signifikant erhöht.Der Volumenanteil der mitochondrienhaltigen Autophagen Vakuolen war zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöht.

Der Zuwachs der Mitochondrien war mit 27 % nach 45 bzw. 17 % nach 60 Tagen nicht so groß, wie in der Literatur beschrieben. Ein Grund dafür dürfte in der kontrollierten Fütterung der Tiere zu sehen sein. Die Zunahme scheint auf Kosten der anderen Organelle, insbesondere des ER, zu erfolgen.

Die Ergebnisse - Zunahme der Mitochondrien und Zunahme der Autophagen Vakuolen mit Mitochondrien - lassen sich nicht mit der Vorstellung einer Segregationsblockade in Einklang bringen. Eher wäre die Möglichkeit einer Destruktionsblockade denkbar, wobei aber die Frage des Mitochondrienzuwachs - Folge einer gesteigerten Neusynthese oder eines verminderten Abbaus - offen bleiben muß.

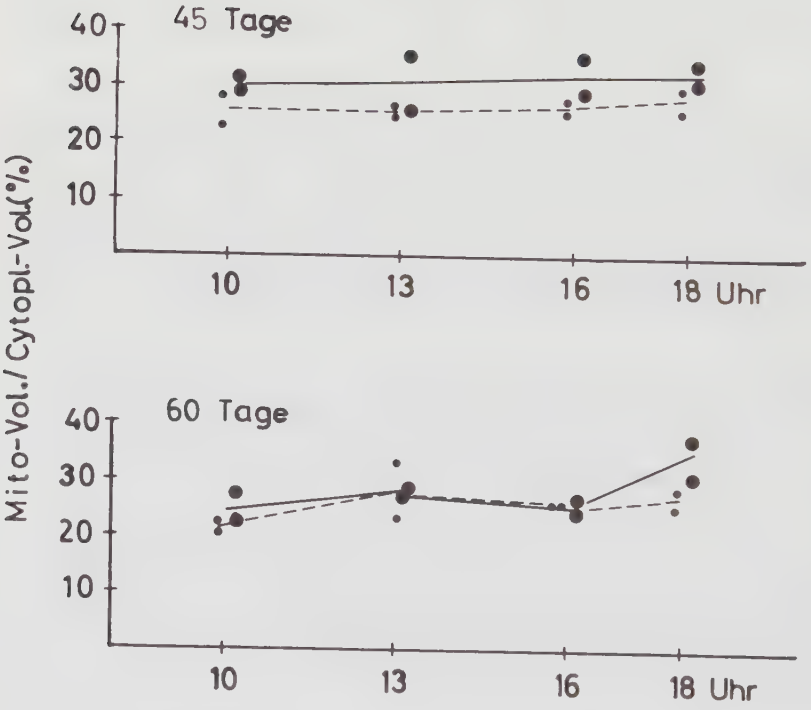


Abb. 1: Volumenanteil der Mitochondrien in Abhängigkeit von der Tageszeit, 45 und 60 Tage nach Versuchsbeginn. (Große Punkte, durchgezogene Linie = DAB, kleine Punkte, unterbrochene Linie = Kontrolltiere).

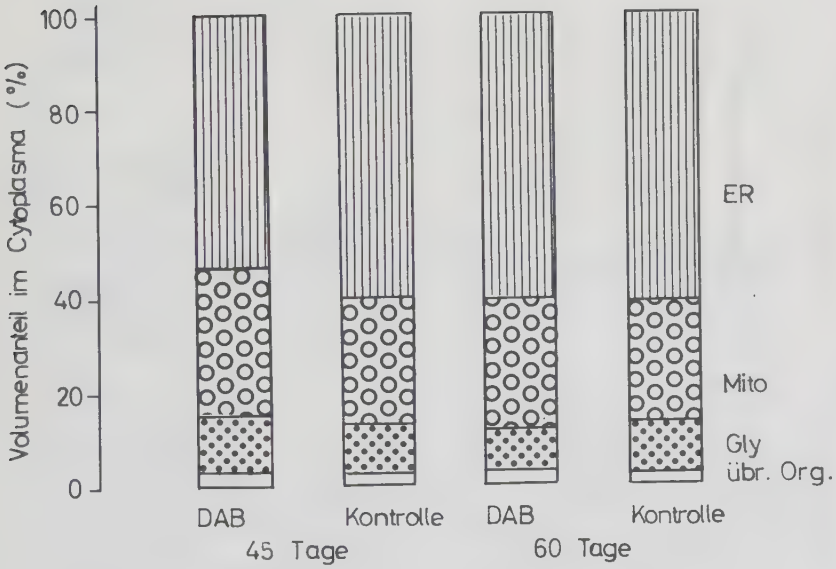


Abb. 2: Relative Volumina von Mitochondrien, Glykogen und ER bei DAB- und Kontrolltieren, 45 und 60 Tage nach Versuchsbeginn.

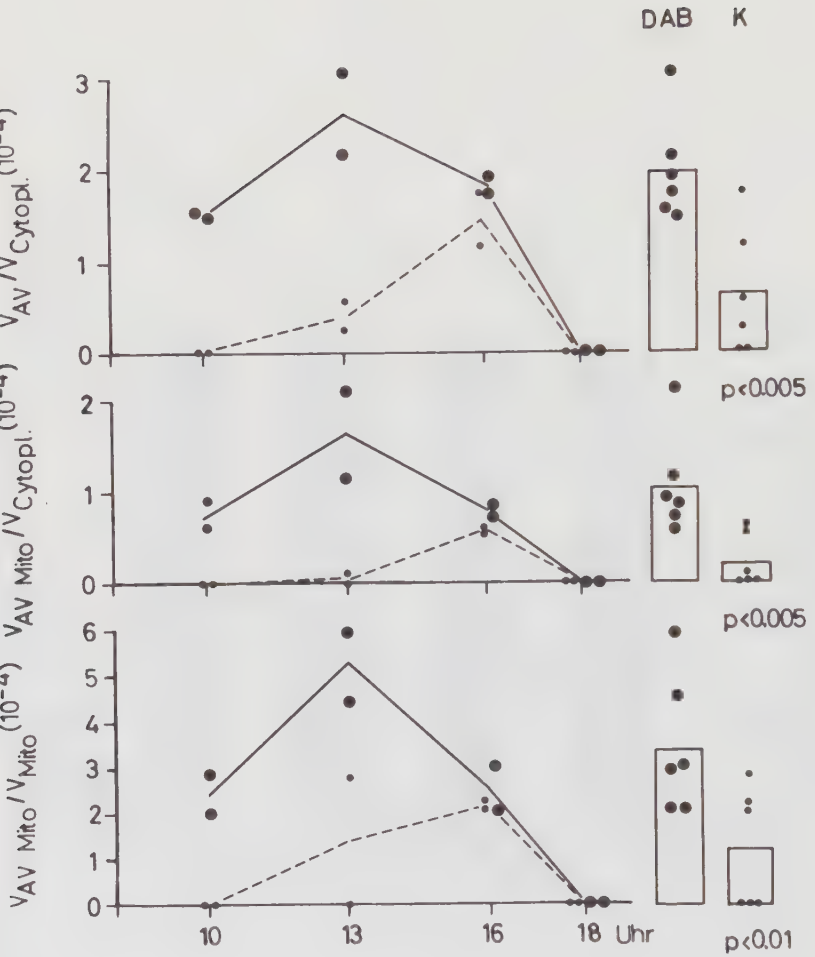


Abb. 3: Volumenanteil aller autophagen Vakuolen (oben), der in autophagen Vakuolen segregierten Mitochondrien (mitte) sowie der segregierten Fraktion der Mitochondrien (unten) 45 Tage nach Versuchsbeginn. Die Säulen rechts geben die Mittelwerte für den Zeitraum zwischen 10 und 16 Uhr an. (Große Punkte, durchgezogene Linie = DAB-, kleine Punkte, unterbrochene Linie = Kontrolltiere).

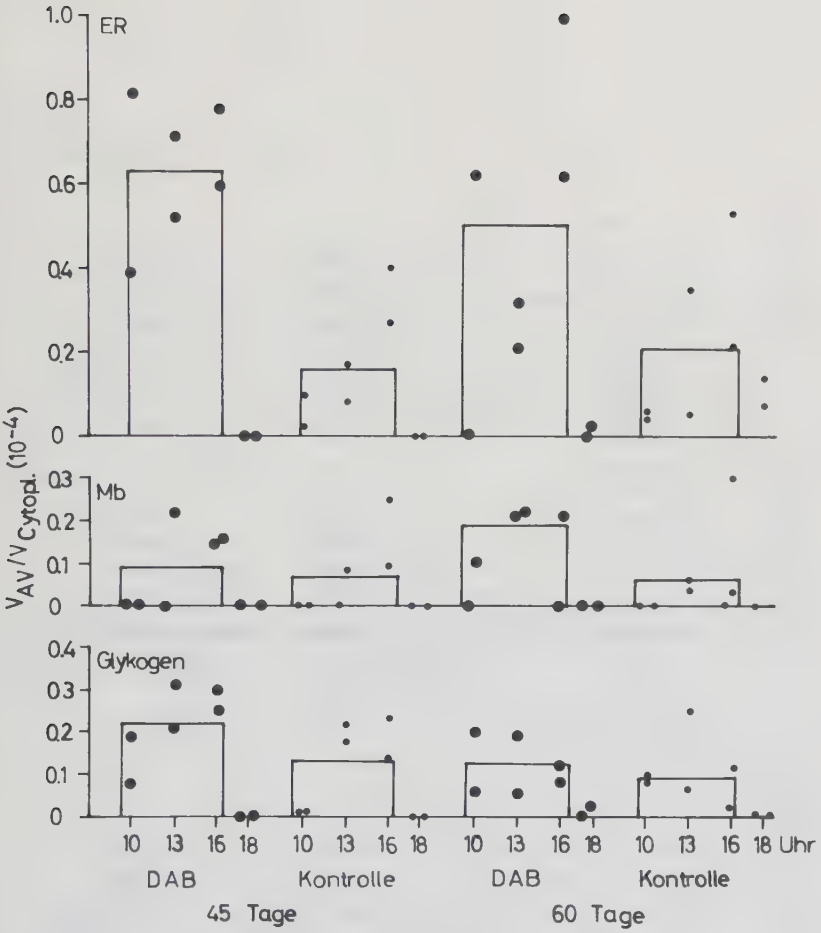


Abb. 4: Volumenanteil aller autophagen Vakuolen (oben), der in autophagen Vakuolen segregierten Mitochondrien (mitte) sowie der segregierten Fraktion der Mitochondrien (unten) 60 Tage nach Versuchsbeginn. Die Säulen rechts geben die Mittelwerte für den Zeitraum zwischen 10 und 16 Uhr an. (Große Punkte, durchgezogene Linie = DAB-, kleine Punkte, unterbrochene Linie = Kontrolltiere).

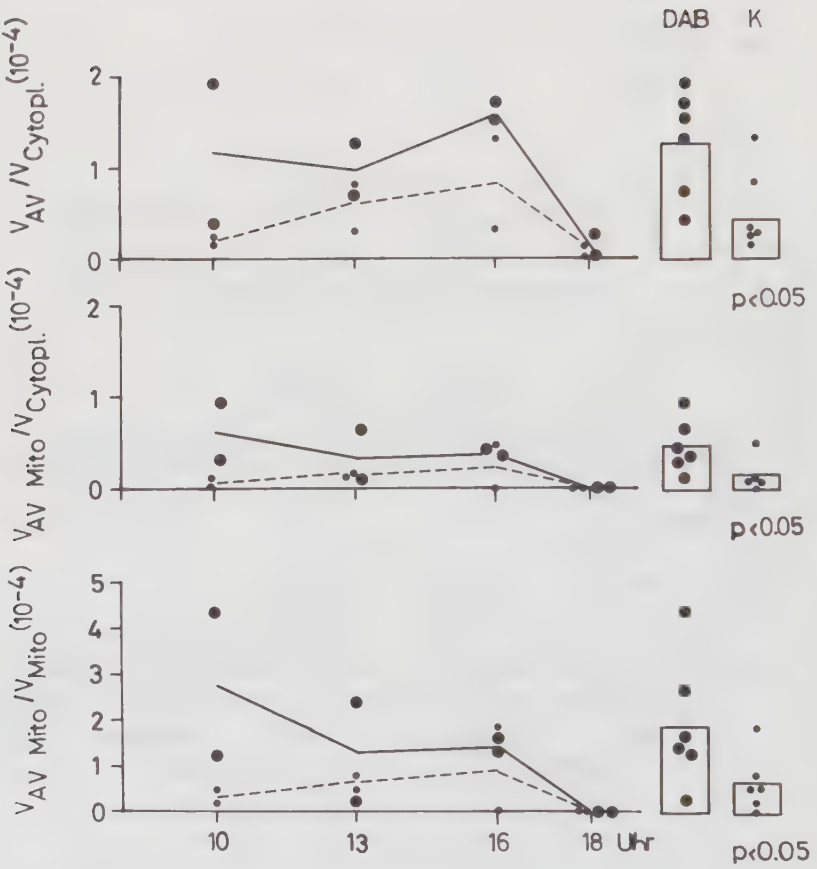


Abb. 5: Schwankungen des Volumenanteils des in autophagen Vakuolen segregierten ER, der Mikrobodies (Mb) und des Glykogens in Abhängigkeit von der Tageszeit (Abszisse) pro Einheitsvolumen. Die Mittelwerte sind als Säulen eingezeichnet (große Punkte = DAB, kleine Punkte = Kontrolle).

Condition	Protein degradation	Autophagic vacuoles
Glucagon	↑ Miller, 1960 Woodside et al., 1974	↑ Ashford and Porter, 1962 Deter, 1971
Amino acid-deprivation	↑ Woodside and Mortimore, 1972 Mortimore and Schworer, 1977	↑ Mitchener et al., 1976 Mortimore and Schworer, 1977
Insulin	↓ Mortimore and Mondon, 1970	↓ Amherdt et al., 1974 Pfeifer, 1978
Cycloheximide	↓ Woodside, 1976	↓ Kovacz et al., 1975 Rumpelt and Weisbach, 1978
Diurnal food-intake	↓ Vidrich et al., 1977 Kairallah et al., 1977	↓ Pfeifer, 1972 Kairallah et al., 1977
Recovery after protein depletion or starvation	↓ Conde and Scornik, 1976 Amils et al., 1977	↓ Pfeifer and Bertling, 1977
Regeneration after partial hepatectomy	↓ Scornik, 1972 Scornik and Botbol, 1976 Hill and Malamud, 1974 Swick and Ip, 1974	↓ Pfeifer, 1976a this paper

Abb. 6: Beispiele aus der Literatur, die eine Korrelation zwischen der Veränderung der Zahl oder des Volumenanteils der Autophagen Vakuolen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen aufzeigen (PFEIFER 1979).

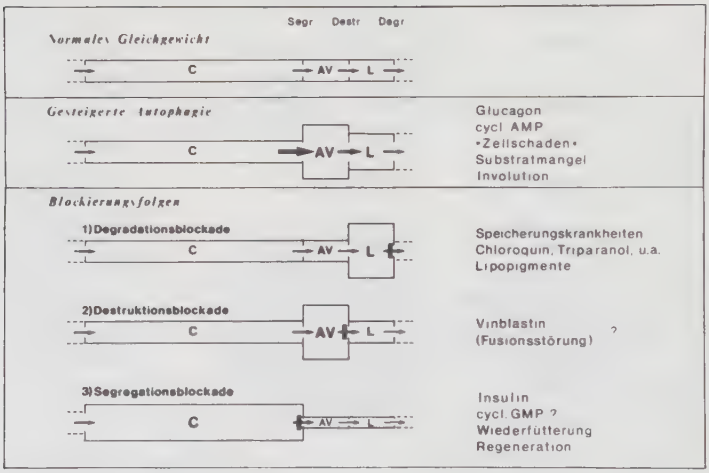


Abb. 7: Schematische Darstellung des normalen Gleichgewichtszustandes zwischen Aufbau der Cytoplasmastrukturen (C) und ihrem Abbau über Autophagie (Pfeil links), der gesteigerten Autophagie und der verschiedenen Blockierungsfolgen (PFEIFER 1976).

Tabelle I

Tiergruppe	Relatives Lebergewicht (Lebergew./Körpergew.)	Rel. Mitochondrienmasse (Vol.anteil Mit. x Leberg./ Körpergew.)
	%	
45 Tage DAB	3,88±0,46	1,20±0,19
45 Tage Kontr.	3,16±0,28	0,84±0,10
t-Test	p<0,01	p<0,001
60 Tage DAB	3,44±0,26	0,95±0,15
60 Tage Kontr.	2,82±0,31	0,71±0,12
t-Test	p<0,001	p<0,01

Zusammenstellung der wichtigsten Werte.
Es sind dargestellt die Mittelwerte der relativen Lebergewichte (Lebergew./Körpergew.) und die relativen Mitochondrienmassen (Volumenanteil Mitochondrien x Lebergew./Körpergew.) 45 und 60 Tage nach Versuchsbeginn bei DAB- und Kontrolltieren.

Tabelle II

Tiergruppe	Volumenanteil der Mitochondrien am Cytoplasma $\frac{V_{Cy(Mit)}}{V_{Cy}}$ %	Volumenanteil der Mit.-Autophagen Vak. am Cytoplasma $V_{AV(Mit.)}/V_{Cy.}$ $\times 10^{-4}$	Segregierte Fraktion der Mitochondrien SF $V_{AV(Mit.)}/V_{Cy.(Mit.)}$ $\times 10^{-4}$
45 Tage DAB	30.95±1.2	1.03±0.22	3.37±0.62
45 Tage Kontr.	26.4±0.81	0.20±0.12	1.18±0.54
t-Test	p<0.05	p<0.005	p<0.01
60 Tage DAB	27.7±1.63	0.46±0.30	1.86±0.56
60 Tage Kontr.	25.5±1.63	0.16±0.17	0.65±0.29
t-Test	n.s.	p<0.05	p<0.05

Zusammenstellung der wichtigsten Werte.
Es sind dargestellt die Mittelwerte der Volumenanteile der Mitochondrien am Cytoplasma, der in Autophagen Vakuolen segregierten Mitochondrien am Cytoplasma, sowie der segregierten Fraktion der Mitochondrien 45 und 60 Tage nach Versuchsbeginn bei DAB- und Kontrolltieren.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ALTMANN, H.-W.: Allgemeine morphologische Pathologie des Cytoplasmas. Die Pathobiosen.
In: Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Bd. II/1, 419-612 (1955)

AMHERDT, M., HARRIS, V., RENOLD, A., ORCI, L., UNGER, R.H.: Hepatic autophagie in uncontrolled experimental diabetes and its relationships to insulin and glucagon.
J.Clin. Invest. 54, 188-193 (1974)

ARSTILA, A.U., TRUMP, B.F.: Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration.
Am. J. Path. 53, 687-733 (1968)

ASHFORD, T.P., PORTER, K.R.: Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes.
J. Cell.Biol. 12, 198-202 (1962)

BERTLING, J.: Veränderungen der Leberzelle in der Phase der Wiederfütterung nach fünftägigem Hunger.
Inaug. Diss., Würzburg (1975)

DE DUVE, C., WATTIAUX, R.: Functions of the lysosomes.
Ann. Rev. Physiol. 28, 435-492 (1966)

DETER, R.L.: Quantitative characterization of dense body, autophagic vacuoles and acid phosphatase bearing particle populations during the early phases of glucagon - induces autophagy in rat liver.
J. Cell Biol. 48, 437-489 (1971)

DETER, R.L., DE DUVE, C.: Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy on some physical properties of rat liver lysosomes.
J. Cell Biol. 33, 437-449 (1967)

ERICSSON, J.L.E.: Mechanism of cellular autophagy.
In: Lysosomes in Biology and Pathology.
Edts. J. Dingle and H.B. Fell, North Holland Publ. Co Amsterdam-London, Vol. II, 345-394 (1969)

FIALA, E.S., KETTERING, W.G., FIALA, S.: Alteration of protein degradation in mitochondria and other rat liver fractions as a result of aminoazodye feeding.
Biochim. Biophys. Acta 338, 43-56 (1974)

LAFONTAINE J.G., ALLARD, C.: A light and electron microscope study of the morphological changes induced in rat liver cells by the azo dye 2-Me-DAB. J. Cell Biol. 22, 143-72 (1964)

LOUD v., A.: A quantitative sterological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. J. Cell Biol. 37, 27-46 (1968)

MILLER, L.I.: Glucagon: a protein catabolic hormone in the isolated perfused rat liver. Nature 185, 248 (1960)

MORTIMORE, G.E., MONDON, C.E.: Inhibiton by insulin of valine turnover in liver. J. Biol. Chem. 245, 2375-2383 (1970)

MÜLLER, O.: Der circadiane Glycogenrhythmus der Rattenleber (Biochemie, quantitative Histochemie, elektronenmikroskopische Morphometrie). Acta Histochem. Suppl.XVI, 139-144 (1976)

ORMANNS, W.: Morphometrische Untersuchungen über tagesrhythmische Schwankungen der cellulären Autophagie im exokrinen Pankreas unbehandelter Ratten. Inaug. Diss. Würzburg, 1976

PFEIFER, U.: Probleme der cellulären Autophagie. Morphologische, enzymcytochemische und quantitative Untersuchungen an normalen und alterierten Leberzellepithelien der Ratte. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. 44/4 (1971)

PFEIFER, U.: Cellular autophagy and cell atrophy in the rat liver during long-term starvations. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 12, 195-211 (1973)

PFEIFER, U.: Lysosomen und Autophagie. Verh. Dtsch. Ges. Path. 60, 28-64 (1976)

PFEIFER, U.: Quantification of rarely occuring structures in electron microscopy. NBS Special Publ. 431 Proc. 4th Int. Congr. Stereol. 411-414 (1976)

PFEIFER, U.: Inhibition by insulin of the formation of autophagic vacuoles in rat liver. A morphometric approach to the kinetics of intracellular degradation by autophagy. J. Cell Biol. 78, 152-167 (1978)

PFEIFER, U.: Inhibited autophagic degradation of cytoplasma during compensatory growth of liver cells after partial hepatectomy Virchows Arch. B Cell Path. 30, 313-33 (1979)

PFEIFER, U., SCHELLER, H.: A morphometric study of cellular autophagy, including diurnal variations, in kidney tubules of normal rats.
J. Cell Biol. 64, 608-624 (1975)

STRIEBICH, M.J., SHELTON, E., SCHNEIDER, W.C.: Quantitative morphological studies on the liver and liver homogenates of rats fed 2-Methyl- or 3-Methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene.
Cancer Res. 13, 279-284 (1953)

WEIBEL, E.R., KISTLER, G.S., SCHERLE, W.F.: Practical sterologigal methods for morphometric cytology.
J. Cell Biol. 30, 23-28 (1966)

WEIBEL, E.R.: Stereological principeles for morphometry in electron microscopic cytology.
Int. Rev. Cytol. 26, 235-302 (1969)

WOODSIDE, K.H., WARD, W.F., MORTIMORE, G.E.: Effects of glucagon on general protein degradation and synthesis in perfused rat liver.
J. Biol. Chem. 249, 5458-5463 (1974)

Herrn Professor U. Pfeifer danke ich für die Überlassung des Themas, für das Referat und die wohlwollende Betreuung.

Herrn Professor H.-W. Altmann danke ich für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut und die Übernahme des Korreferates.

Außerdem danke ich Frau Bergeest, Frau Hagen und Frau Werder für ihre wertvolle Unterstützung im technischen Teil der Arbeit.

Lebenslauf

Dieter Russ, geb. am 14.03.1953 in Göppingen als Sohn des Technikers Alfred Russ und seiner Ehefrau Emilie, geb. Krapf.

Schulbildung

1960-62 Volksschule Albershausen
1962-65 Volksschule Schlierbach
27.4.65 Eintritt in das Schloß-Gymnasium Kirchheim/Teck
19.6.73 Reifeprüfung

Studiengang

1973-74 Medizinstudium an der Universität Lüttich
1974-75 Romanistik- und Sportstudium an der Universität Tübingen
1976-81 Medizinstudium an der Universität Würzburg
5.11.81 Ärztliche Prüfung
9.11.81 Erteilung der Approbation

Fachausbildung

seit 15.01.81 Pathologisches Institut der Universität Aachen

Dieter Russ

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80